

## ジャガイモ塊茎の冷却貯蔵および切断に伴う活性酸素消去系酵素の活性変動

藤江歩巳・大羽和子

### Effect of Cold-Storage and Slicing of Potato Tubers on the Antioxidant Enzyme Activities

Ayumi FUJIE and Kazuko OBA

#### 緒 言

ジャガイモ塊茎はビタミンC含量が比較的多く、一度に食する量も多いので、ビタミンCのよい供給源である。しかし、収穫時期が春と秋で貯蔵性に富んでいるので、他の時期は貯蔵した塊茎を食している。ジャガイモ塊茎の貯蔵温度は、低いほど休眠期間を延長することが可能になり、発芽を抑制できるので、通常10℃以下の低温で貯蔵される。著者らは、7品種のジャガイモ塊茎を4℃に貯蔵すると、ビタミンC量は1ヵ月後に顕著に減少し、1~2ヶ月の間は変化がなく、2~3ヶ月後に再び減少し、3ヵ月後のビタミンC量は収穫時の1/2~1/3になることを報告した。ビタミンC合成酵素であるL-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ活性は、ビタミンC量が著しく減少する時期および貯蔵2ヶ月以降のビタミンC量の低い時期に高くなった。ジャガイモ塊茎を4℃に貯蔵した場合の方が15℃に貯蔵した場合よりも、L-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ活性は高く保たれたにもかかわらず、ビタミンC量の減少が大きくなった<sup>1)</sup>。植物が低温ストレスを受けると、活性酸素が発生することが知られている<sup>2-6)</sup>。活性酸素の発生が多くなると、抗酸化剤として働くビタミンCやE量の消費が多くなることが考えられる。ジャガイモやイネ、トウモロコシなどを低温にさらすと、活性酸素が生成され、それに伴い活性酸素消去系酵素であるカタラーゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ活性が増大するという報告がある<sup>7-11)</sup>。そこで、生鮮食品の貯蔵や調理に際して、植物の種々のストレスに対する応答反応を考慮し、それを利用したり、制御することによって食品の品質の劣化を抑制することが望ましい。

本研究では、ジャガイモ塊茎を冷却貯蔵や切断放置すると活性酸素消去系の酵素活性がどのように変動するかを追跡し、これらの調理操作の過程で活性酸素が生成するかいなかを解明することを目的とした。活性酸素消去系の酵素としては、 $O_2^-$ を速やかに $H_2O_2$ に変換するスーパーオキシドジスムターゼと、 $H_2O_2$ を水と酸素分子に変換するカタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変動を追跡した。

## 実験方法

### 1. 材料および貯蔵方法

農林水産省北海道農業試験場において10月上旬に収穫された5品種のジャガイモ塊茎(男爵, とうや, キタアカリ, トヨシロ, メークイン), 北海道立北見農業試験場において10月中旬に収穫された北育2号の塊茎, および切断実験には市販の北海道産ジャガイモ塊茎2品種(男爵, メークイン)を試料として用いた. 農林水産省北海道農業試験場および北海道立北見農業試験場のものについては, 収穫後4~5日で入手した.

### 2. ジャガイモ塊茎の貯蔵および切断と組織の調製

ジャガイモ塊茎をダンボール箱に入れて温度4℃, 湿度100%の条件で貯蔵し(冷却貯蔵), 1ヶ月, 2ヶ月, 3ヶ月後に取り出して分析に使用した.

個体差をなくすため, ジャガイモ塊茎2~3個から試料を無作為に抽出した.

1) 新鮮組織: 塊茎を水道水で洗った後, 蒸留水で洗い, ろ紙で水分を取り除き, 皮層を取り除いた柔組織の部分から5.0gを秤量した.

2) 切断組織の調製: プラスチックケースと金網は, 70%エタノール溶液で消毒した. 塊茎は, 皮層を取り除いた柔組織の部分を1cm幅の半月切りにし, 水道水で洗った後, 蒸留水で洗い, 水分をろ紙で取り除いた. プラスチックケースの底に乾燥防止のため, 蒸留水で湿らせたろ紙を入れ, ステンレスの金網を敷いた上に半月切片を立てた. ケースのふたを少し開け, 4℃と18℃で一定時間(24, 48, 72時間)放置後, 切断面の表面から1mmの厚さを切り取り, 5.0gを秤量し分析に供した.

### 3. 粗酵素液の調製

使用器具および緩衝液は予め低温(0~4℃)にしておき, 以下, 全ての操作は低温(4℃以下)で行った. 試料5.0gを30mMメルカプトエタノールを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)15mlとともにホモブレンダー(佐久間製作所製, 500ACD)で30秒間磨砕した. 磨砕液を2重のナイロンガーゼでろ過した後, ろ液を遠心分離(4℃, 14,000rpm, 20分間)して, 上清を得た. 上清2.5mlを10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1.5×5.5cm)に通し, 10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)3.5mlで280nmに吸収をもつタンパク質画分を溶出し, 粗酵素液とした.

### 4. カタラーゼ活性の測定<sup>12)</sup>

50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)300μlと粗酵素液300μlを混ぜ, 31mM過酸化水素水300μlを加え, 反応させた(25℃). 過酸化水素に由来する240nmの吸光度の減少を追跡し, 1分間当たりの吸光度の減少量を算出し, 240nmにおける過酸化水素の分子吸光係数(1μmol/ml=0.036)より酵素活性(μmol/min/g)を求めた.

### 5. アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定<sup>13)</sup>

0.2mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)250μl, 10mMアスコルビン酸溶液17μlに粗酵素液と蒸留水を合わせて723μlを加え, 最後に10mM過酸化水素水10μlを入れ全量1.0mlで反応させた(25℃). アスコルビン酸に由来する265nmの吸光度の減少を追跡し, 1分間当たりの吸光度

の減少を算出し，酵素活性 ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g}$ ) を求めた．

## 6．スーパーオキシドジスムターゼ活性の測定<sup>13, 14)</sup>

300mM リン酸カリウム緩衝液 (含EDTA-2Na) (pH 7.8) 5 ml, 60  $\mu\text{M}$  チトクロムC水溶液 5 ml 0.3mMキサンチン水溶液 5 ml 3.5mM アジ化ナトリウム水溶液10mlを混合した (Mixture). Mixture 500  $\mu\text{l}$  粗酵素液と蒸留水を合わせて70  $\mu\text{l}$  0.029  $\mu\text{M}$  キサンチンオキシダーゼ溶液30  $\mu\text{l}$ を加え，チトクロムCに由来する550nmの吸光度の増加を追跡し，1分間当たりの吸光度の増加量を算出し，吸光度の変化を50%阻害するスーパーオキシドジスムターゼ量を1単位 (U) とした．50%阻害量を知るために粗酵素液量を変え，その近くのいくつかの点での阻害率を片対数方眼紙を使用し求め，ジャガイモ塊茎グラム当たりの酵素活性 (U/g) を求めた．

## 7．タンパク質の定量

子牛血清アルブミンを標準タンパク質として用い，Bradfordの方法<sup>15)</sup>に従い，タンパク質量を求めた．

### 実験結果および考察

#### 1．ジャガイモ塊茎6品種の活性酸素消去系酵素の活性

6品種のジャガイモ塊茎 (キタアカリ，男爵，とうや，トヨシロ，北育2号，メークイン) のカタラーゼ活性，アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性，スーパーオキシドジスムターゼ活性をFig.1に示した．酵素活性の高い4品種と低い2品種に分類できた．活性の高い品種の中では，タンパク質mg当たりのカタラーゼ活性をみると，キタアカリ>男爵>トヨシロ>とうやの順に高く 40.1~25.0  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  proteinであり 活性の低い北育2号，メークインでは20.5と16.9  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  proteinであった．アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は，とうや>キタアカリ>男爵>トヨシロの順に高く0.70~0.49  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  proteinであったが，北育2号，メークインでは0.32, 0.35  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  proteinと活性は低かった．スーパーオキシドジスムターゼ活性は，男爵>キタアカリ>とうや>トヨシロの順に高く，191~147U/mg proteinであり，北育2号とメークインの活性は110, 87U/mg proteinと低かった．

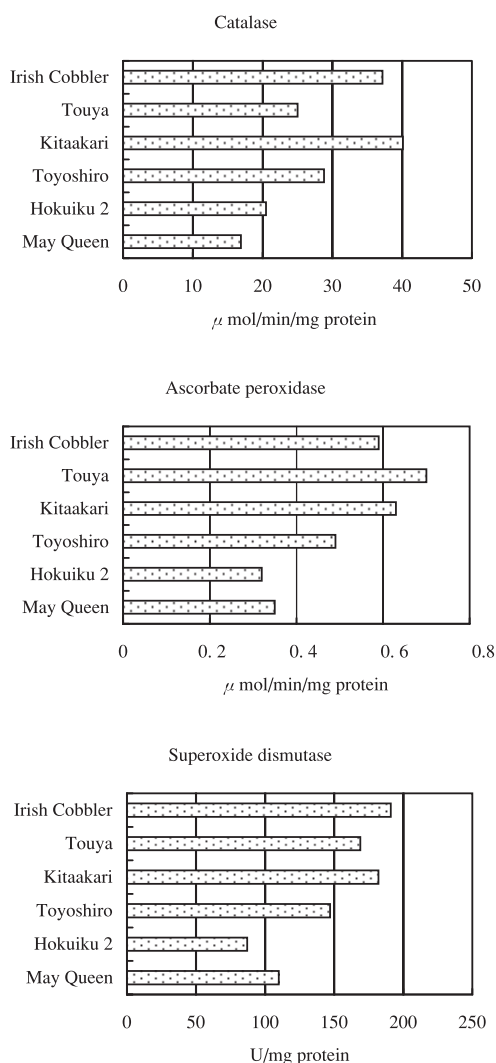


Fig. 1 Antioxidant Enzyme Activities of Potato Tubers

以上の結果, 活性酸素消去系の3酵素, カタラーゼ, アスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼの活性は, 男爵, とうや, キタアカリおよびトヨシロで高く, 北育2号, メークインの活性が低かったため, 栽培場所よりも品種により酵素活性の大小が決まることが示唆された。

また, 過酸化水素消去系酵素のうちカタラーゼとアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性を比較すると, キタアカリ, 北育2号のカタラーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の64倍であり, 男爵のカタラーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の63倍, トヨシロでは59倍, メークインでは48倍, とうやでは36倍で, カタラーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の64~36倍であった。したがって, 過酸化水素の消去に主に関わっている酵素はカタラーゼであることが示唆された。

## 2. 冷却貯蔵に伴う活性酸素消去系酵素の活性変動

酵素活性の高い品種と低い品種の中から一般によく食されている男爵とメークインを試料として, 塊茎を4℃で貯蔵した場合の酵素活性の変動をFig. 2に示した。

カタラーゼ活性についてみると, 活性の変動が顕著で, 男爵では, 貯蔵2日後に73%に減少し, その後1週間までに81%に増加し, 2週間後に64%に減少し, 以後ゆるやかに変動した。メークインについても男爵と同じ傾向が見られ, 貯蔵2日後に72%まで減少し, 4日後に76%に増加し, 2週間後に51%に減少し, 以後ゆるやかに変動した。

スーパーオキシドジスムターゼ活性についてみると, 男爵では, 4日後に1.3倍に増加し, 2週間後に貯蔵前と同レベルまで下がり, その後増加する傾向にあった。メークインでは, 2週間後に73%に減少し, その後増加する傾向にあった。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性についてみると, 男爵では, 2週間後に69%に減少し, その後ほぼ一定であった。メークインでは, 1週間後に67%に減少し, その後ほぼ一定であった。以上の結果から, これらの酵素活性の変動は, 室温から低温へと温度が著しく変化する貯蔵初期に顕著に変動するが, 貯蔵期間が長くなるとジャガイモ塊茎が貯蔵温度に馴化するために貯蔵初期に比べ変動がゆるやかになることが示唆された。

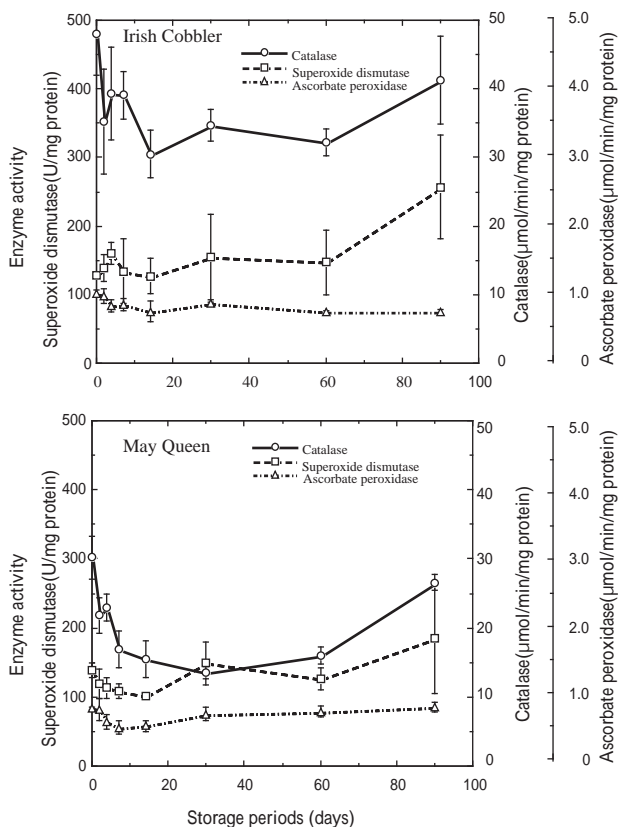


Fig. 2 Changes in the Activities of Catalase, Ascorbate Peroxidase and Superoxide Dismutase of Potato Tubers during Storage at 4℃ for 3 Months

### 3. 塊茎の切断に伴う活性酸素消去系酵素の活性変動

男爵とメークインの塊茎を切断後、4 と18 で放置したときのカタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ活性の変動をFig.3-1 および 3-2に示した。

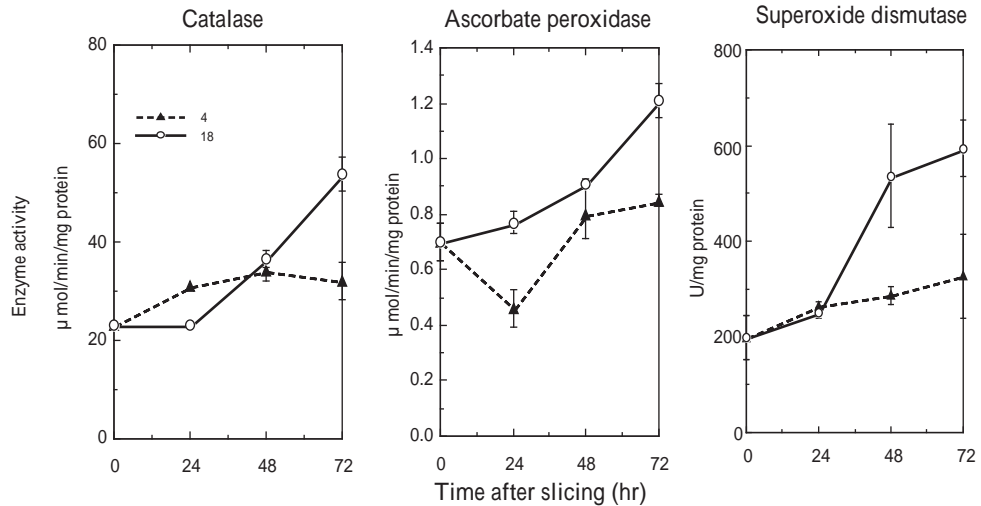


Fig. 3-1 Changes in the Activities of Catalase, Ascorbate Peroxidase and Superoxide dismutase of Potato Tuber Tissue (cv. Irish Cobbler) during Incubation at 4 or 18 after Slicing

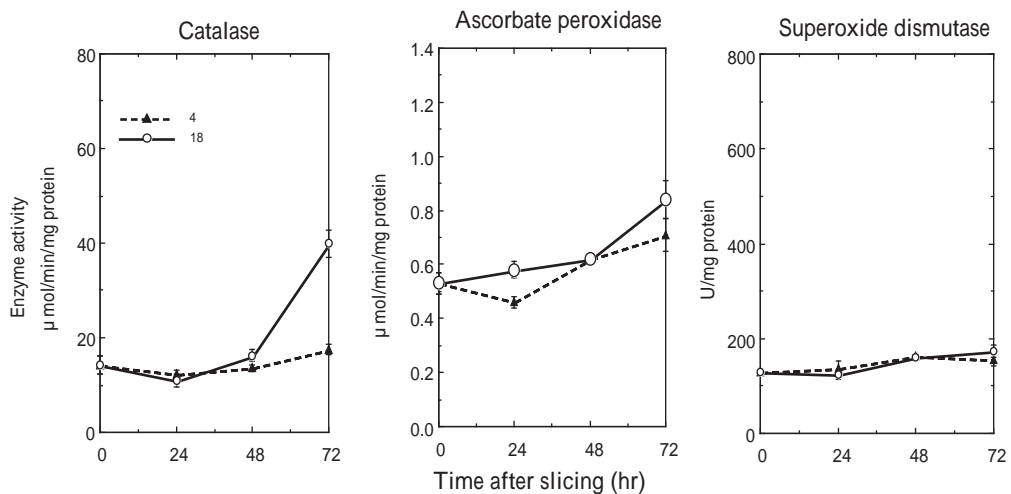


Fig. 3-2 Changes in the Activities of Catalase, Ascorbate Peroxidase and Superoxide dismutase of Potato Tuber Tissue (cv. May Queen) during Incubation at 4 or 18 after Slicing

男爵塊茎を切断後4 に放置すると、カタラーゼ活性は、切断直後には $23.2 \mu\text{mol/min/mg protein}$ であったのが、24時間後には1.3倍に増加しており、その後活性は徐々に増加し、72時間後には切断直後の1.4倍になった。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、切断直後 $0.70 \mu\text{mol/}$

min/mg proteinで、24時間後に一旦減少し、72時間後には1.2倍に増加した。スーパーオキシドジスムターゼ活性は、切断直後198U/mg proteinで、その後徐々に増加し72時間後には切断直後の1.7倍に増加した。18 に放置すると、放置後24時間以降に活性が顕著に増大した。いずれの酵素活性も4 に放置したときよりも18 に放置した方が活性の増大が大きく、切断放置後72時間では、カタラーゼ活性は直後の2.3倍に、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は1.7倍に、スーパーオキシドジスムターゼ活性は3倍に増加した。

メークイン塊茎の切断放置後の活性の変動も男爵と同じ傾向がみられた。4 放置では、カタラーゼ活性は、切断直後14.2  $\mu\text{mol/min/mg protein}$ で72時間後には1.2倍になった。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、切断直後0.53  $\mu\text{mol/min/mg protein}$ で、72時間後には1.3倍に増加した。スーパーオキシドジスムターゼ活性は、切断直後130U/mg proteinであり、72時間後には1.2倍になった。18 放置では、いずれの酵素活性も4 に放置したときよりも活性の増大が顕著で、72時間放置で、カタラーゼ活性は2.8倍に、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は1.6倍に、スーパーオキシドジスムターゼ活性は1.3倍に増加した。

ジャガイモの生物としての最適温度が18~20 であるので、切断後18 に放置した方が切断ストレスに対して積極的に応答するため、4 に放置した場合に比べ活性酸素消去系酵素の活性増大が顕著であったと考えられる。

筆者ら<sup>16)</sup>は、すでに、植物性食品の切断放置に伴うアスコルビン酸量、その合成・酸化酵素活性の変動および活性酸素消去系酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の変動を解析した。その結果、タマネギを切断後25 に放置すると、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が1日後に1.5倍、2日後に1.6倍まで増加しその後減少し、また、切断後25 に1日放置した後4 に移すと、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性はその1日後(切断2日後)から顕著に増加し、25 に3日間放置した場合に比べて活性が高く、切断3日(4 に移して2日後)後には切断直後の2倍以上に増大することを明らかにした。

本研究において、切断放置により活性酸素消去系酵素活性が増大したことは前論文<sup>16)</sup>の結果と矛盾しない。

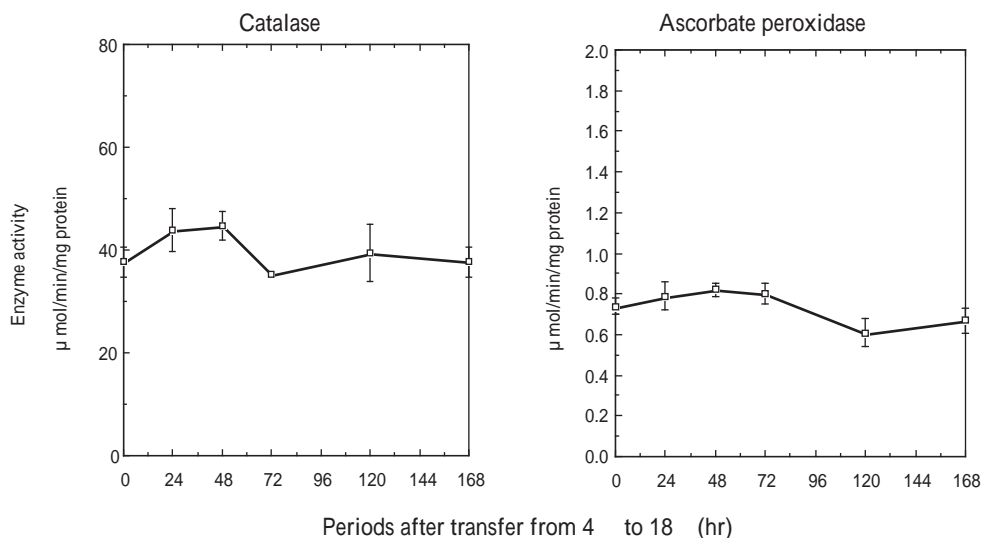


Fig. 4 Changes in the Activities of Catalase, Ascorbate Peroxidase and Superoxide Dismutase of Potato Tuber (cv. Irish Cobbler) during Storage at 18 after Transfer from 4



#### 4. 塊茎の貯蔵温度の変化に伴う活性酸素消去系酵素の活性変動

塊茎を切断後異なる温度に放置した場合、4℃より18℃放置の方が酵素活性の増大が大きかった。これは、4℃で貯蔵したジャガイモ塊茎を18℃に移した温度ストレスの影響なのか、切断ストレスの影響なのかを明らかにするために、4℃に貯蔵した男爵塊茎を丸のまま18℃に一定時間移し、活性酸素消去系酵素の活性変動を追跡した (Fig.4)。

塊茎を4℃から18℃に移す直前のカタラーゼ活性は $37.7 \mu\text{mol/min/mg protein}$ であったが、移して24時間後には $43.8 \mu\text{mol/min/mg protein}$ になり、16%の活性増加が観察され、48時間後には119%に増大し、最大の $44.7 \mu\text{mol/min/mg protein}$ に達したが、その後は最初の値にまで活性が下がり、168時間後まで変動しなかった。塊茎のままで温度変化に伴う活性の変動幅は切断放置後の変動幅に比べて小さいことが確認された。

塊茎を4℃から18℃に移す直前のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は $0.74 \mu\text{mol/min/mg protein}$ であり、移して24時間後 $0.79 \mu\text{mol/min/mg protein}$ 、48時間後 $0.82 \mu\text{mol/min/mg protein}$ と若干増加し、72時間後 $0.80 \mu\text{mol/min/mg protein}$ と変動せず、120時間後 $0.61 \mu\text{mol/min/mg protein}$ と減少し、168時間後 $0.67 \mu\text{mol/min/mg protein}$ と若干増加した。活性の変動幅は小さかった。

塊茎を4℃から18℃に移した後48時間までのカタラーゼ活性とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が徐々に増加したのは、温度(変温)ストレスにより活性酸素が生成されたため過酸化水素消去系酵素の活性が増大したと考えられる。また、48時間以降の減少は、ジャガイモ塊茎が貯蔵温度に馴化したためと考えられる。

したがって、切断放置した場合、4℃より18℃放置の方が酵素活性が著しく増大したのは、温度ストレスに対する応答と考えるよりは、切断ストレスに対するジャガイモ塊茎のポジティブな応答の結果であると考えられる。

#### 5. 切断および温度ストレスに伴う活性酸素消去系酵素の活性変動

男爵塊茎の切断放置に伴うカタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼの活性変動と、冷却貯蔵に伴うこれらの酵素の活性変動を比較した (Fig. 2, 3-1)。

切断ストレスの場合、カタラーゼ活性は切断後18℃に3日間放置すると切断直後の2.3倍に増加し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は3日間で1.7倍に増加し、スーパーオキシドジスムターゼ活性は3日間で3倍に増加した。それに対し塊茎の冷却貯蔵による低温ストレスの場合、カタラーゼ活性は2週間で64%に減少し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は2週間で74%に減少し、スーパーオキシドジスムターゼ活性は3ヶ月間で1.3倍に増加した。

以上の結果から、塊茎の切断放置と冷却貯蔵中の活性酸素消去系酵素の活性変動を比較すると、切断後のこれらの酵素活性変動に比べ冷却貯蔵中の活性変動は小さいことが明らかになった。したがって、塊茎が受ける温度ストレスよりも切断ストレスの方が植物体内における活性酸素の生成量が多く、それを消去するために活性酸素消去系の活性が増大することが示唆された。

## 要 約

- 1) ジャガイモの品種によって塊茎中に存在する活性酸素消去系酵素のカタラーゼ, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ, スーパーオキシドジスムターゼの酵素活性が異なった。活性の高い品種は, 男爵, とうや, キタアカリ, トヨシロであり, 活性の低い品種はメークイン, 北育2号であった。
- 2) カタラーゼ活性はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の36~64倍と高かった。したがって, 過酸化水素の消去に主に関わっている酵素はカタラーゼである可能性が高いことが示唆された。
- 3) 塊茎を冷却貯蔵や切断放置すると活性酸素消去系酵素活性が増大したので, 温度ストレスや切断ストレスにより活性酸素が生成されることが示唆された。また, 切断ストレスの方が低温ストレスよりも活性酸素消去系酵素活性の変動が顕著であった。
- 4) 収穫直後の方が貯蔵した塊茎よりストレス刺激に対する応答が大であった。

ジャガイモ塊茎を供与いただいた農林水産省北海道農業試験場および北海道立北見農業試験場に感謝致します。

本研究の一部は, 名古屋女子大学平成16年度特別研究助成費により行われたものであることを記し, 謝意を表します。

## 文 献

- 1) 大羽和子, 山本淳子, 舟橋由美, 小原明子, 石井現相, 梅村芳樹: ジャガイモ塊茎の生育および冷却貯蔵に伴うビタミンC量およびその合成酵素活性の変化, 日本調理科学会誌, 32 (2), 102~108 (1999)
- 2) 旭正編: 植物の機能, pp.135~164, (株) 岩波書店 (1991)
- 3) 谷口直之監修, 藤井順逸, 鈴木敬一郎編: 活性酸素Q&A, pp.10~13, (株) 医薬ジャーナル社 (1996)
- 4) 丸尾文治, 田宮信夫監修: 酵素ハンドブック, pp.158, 202~203, (株) 朝倉書店 (1987)
- 5) 蓮沼仰嗣, 平野久編: 植物のシグナルトランスダクション, pp.108~116, (株) 東京化学同人 (1996)
- 6) 谷口直之監修 須磨春樹編: 活性酸素実験プロトコール 測定法・遺伝子分析・病態生理モデル, pp.10, (株) 秀潤社 (1994)
- 7) Mizuno, M., Kamei, M., and Tsuchida, H.: Ascorbate peroxidase and Catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tuber during low temperature storage, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 44, 717~726 (1998)
- 8) Saruyama, H., Tanida, M.: Effect of chilling on activated oxygen scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Science*, 109, 105~113 (1995)
- 9) Spychalla, J. P., and Desborough, S. L.: Superoxide Dismutase, Catalase, and  $\alpha$ -Tocopherol content of stored potato tubers, *Plant Physiol.*, 94, 1214~1218 (1990)



- 10) Tottempudi, K., and Prasad, T. K.: Role of Catalase in inducing chilling tolerance in preemergent Maze Seedlings, *Plant Physiol.*, 114, 1369 ~ 1376 ( 1997 )
- 11) Kawakami, S., Mizuno, M., and Tsuchida, H.: Comparison of antioxidant enzyme activities between *Solanum tuberosum* L. cultivars Danshaku and Kitaakari during low-temperature storage, *J Agric. Food Chem.*, 48 ( 6 ) , 2117 ~ 2121 ( 2000 )
- 12) Hugo Aebi : Catalase *in vitro*, *Methods in Enzymology*, 105, 21 ~ 126 ( 1984 )
- 13) 浅田浩二：活性酸素 生物での生成・消去・作用の分子機構 蛋白質, 核酸, 酵素 臨時増刊, 33 ( 16 ), p.2906 ~ 2920 , 2957 ~ 2964 ( 1988 )
- 14) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子編：活性酸素測定マニュアル, pp. 96 ~ 103 , ( 株 ) 講談社 ( 1992 )
- 15) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248 ~ 254 ( 1976 )
- 16) 山本淳子, 大羽和子：カット野菜のビタミンC量およびその合成・酸化に関与する酵素の活性, 日本家政学会誌, 50 ( 10 ), 1015 ~ 1020 ( 1999 )